

PCT/JP 2004/014037

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

17. 9. 2004

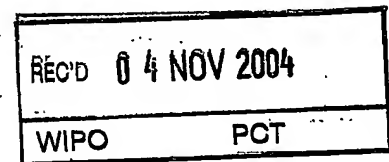
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 9 月 3 0 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 3 4 0 0 6 2
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 3 4 0 0 6 2]

出 願 人 三井化学株式会社
Applicant(s):

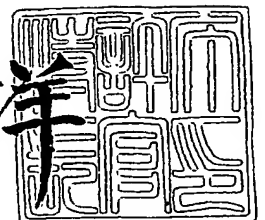


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 0 月 2 2 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川 洋



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 9 5 4 9 7

【書類名】 特許願
【整理番号】 P0002592
【提出日】 平成15年 9月30日
【あて先】 特許庁長官 殿
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内
 【氏名】 徳田 淳子
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内
 【氏名】 和田 光史
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内
 【氏名】 川嶋 美由貴
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内
 【氏名】 高橋 均
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内
 【氏名】 望月 大資
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内
 【氏名】 阿部 玲子
【特許出願人】
 【識別番号】 000005887
 【氏名又は名称】 三井化学株式会社
 【代表者】 中西 宏幸
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 005278
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

該微生物が本来有している FAD 依存性 D-乳酸デヒドロゲナーゼ (d l d) が不活化あるいは低減されている微生物であって、ピルベートホルメトリアーゼ (p f l B) が不活化あるいは低減されている、且つ／または NADH 依存性 D-乳酸デヒドロゲナーゼ (l d h) の細胞内活性が増強されていることを特徴とする微生物。

【請求項 2】

微生物が細菌である請求項 1 に記載の微生物。

【請求項 3】

細菌がエシェリヒア コリである請求項 2 に記載の細菌。

【請求項 4】

請求項 1～3 の何れか一項に記載の微生物を液体培地で培養し、培養液中に D-乳酸を生成蓄積せしめ、培養液から D-乳酸を分離することを特徴とする D-乳酸の生産方法。

【請求項 5】

FAD 依存性 D-乳酸デヒドロゲナーゼ (d l d) が不活化あるいは低減されている微生物を液体培地で培養し、培養液中に D-乳酸を生成蓄積せしめ、培養液から D-乳酸を分離することを特徴とする D-乳酸の生産方法。

【請求項 6】

微生物が細菌である請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

細菌がエシェリヒア コリである請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

通気条件下で培養することを特徴とする請求項 5～7 の何れか一項に記載の方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】ピルビン酸含量を低減したD-乳酸生産方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、FAD依存性D-乳酸デヒドロゲナーゼが不活化あるいは低減されている微生物を用いることを特徴とするD-乳酸の生産方法に関する。

【背景技術】

【0002】

乳酸にはL-乳酸とD-乳酸（以下、それぞれL体、D体と略することがある）の2種類の光学異性体が存在するが、L-乳酸については、既に微生物発酵を利用した産業生産方法が確立しており、そのポリマーは生分解性プラスチックとしてあらゆる産業分野に利用されつつある。L体を高生産する微生物としては、例えば*Lactobacillus* 属細菌が良く知られているが、このような細菌を用いた場合でさえ、ピルビン酸等の副生有機酸が培地中に混入してくることは避けられず、それらを除去するために活性炭処理、反復晶析、イオン交換樹脂や有機溶媒による抽出、電気透析、エステル蒸留などを組み合わせた煩雑で高コストの精製手段を用いる必要がある。ましてやポリマー原料ではなく、医薬品原体あるいは中間体として用いられる場合には、更なる純度の高さが求められる。

【0003】

一方、D-乳酸については、現在のところ微生物発酵を利用した産業生産方法は確立されてはいないが、ポリマー原料や医薬品原体あるいは中間体としての需要の高さはL体と同様であり、D-乳酸の発酵生産に際しては、ピルビン酸等の副生有機酸の培地中への混入を極力抑えることが望まれる。

【0004】

近年、エシエリヒア コリ（以下、大腸菌と呼ぶことがある）の遺伝子を破壊することによって、高純度なD-乳酸を生産しようとする試みが、Zhouらによってなされた〔Zhou, S., Appl. Environ. Microbiol., 69, 399-407 (2003)〕。彼らは野生株大腸菌 W3110 のフマル酸レダクターゼ (frdABCD) 遺伝子、アルコール/アルデヒドデヒドロゲナーゼ (adhE) 遺伝子、ピルベートホルメートリアーゼ (pf1B) 遺伝子、アセテートキナーゼ (ackA) 遺伝子の4重破壊株を作成し、この破壊株を利用してD-乳酸を生産させた場合に、培地中に含まれるコハク酸、ギ酸、酢酸、エタノールといった副生物は顕著に低減できたと報告しているが、ピルビン酸については全く言及していない。ピルビン酸は、D-乳酸生産上の枝経路産物であるコハク酸、ギ酸、酢酸、エタノールといった副生物とは異なり、D-乳酸の反応前駆体に相当する。従って、例えばD-乳酸生産上の主経路に相当する解糖系の構成遺伝子を破壊してピルビン酸生産量を低減させた場合、それに伴いD-乳酸生産量も低減化するという好ましからざる結果を招くことは、当業者なら容易に想像できる。重要なのは、D-乳酸の生産性を低減させることなく、ピルビン酸の生産性を低減化させることであるが、そのような試みの成功例は過去になされていない。

【0005】

一般に微生物においてピルビン酸とD-乳酸の相互変換反応を触媒する酵素は2種類知られている。一つはNADH依存性D-乳酸デヒドロゲナーゼ（以下、ldhと呼ぶことがある）であり、もう一つはFAD依存性D-乳酸デヒドロゲナーゼ（以下、ddlと呼ぶことがある）である。

【0006】

ldhについては、ラクトバチルス プルガリカスやラクトバチルス ヘルベティカス等由来の酵素の研究から、主としてピルビン酸からD-乳酸への反応を触媒することが明らかにされている。

【0007】

一方ddlについては大腸菌から精製された酵素の解析により、ldhとは逆の反応、

すなわちD-乳酸からピルビン酸への反応を主として触媒することが開示されている。過去において、Shawらはdld遺伝子が破壊された大腸菌株JS150とJS151を取得しているが、それらの株におけるD-乳酸生産性やピルビン酸生産性については言及していない[Shaw, L., J. Bacteriol., 121, 1047-1055 (1975)]。またBarnesらは、dldが種々のアミノ酸や糖類の取りこみに関わっていると報告していることから[Barnes, EM., J. Biol. Chem., 246, 5518-5522 (1971)]、微生物においてdldの機能を消失せしめた場合に、そのD-乳酸生産性やピルビン酸生産性がどのように変化するかを予測することは、当業者といえども困難であった。

【0008】

なお大腸菌株の分譲機関の一つであるYale大学付属のE. coli Genetic Stock Center (CGSC) のデータベースでdld遺伝子とpflB遺伝子の2重変異株の検索を行うと、Mat-Janらの論文[Mat-Jan, F., J. Bacteriol., 171, 342-348 (1989)]が該当案件として出力されるが、実際に精査した結果、この論文にはldh遺伝子とpflB遺伝子の2重破壊株についての記述はあるが、dld遺伝子とpflB遺伝子の2重破壊株に関する記述は見られなかった。

【非特許文献1】Zhou, S., Appl. Environ. Microbiol., 69, 399-407 (2003)

【非特許文献2】Shaw, L., J. Bacteriol., 121, 1047-1055 (1975)

【非特許文献3】Barnes, EM., J. Biol. Chem., 246, 5518-5522 (1971)

【非特許文献4】Mat-Jan, F., J. Bacteriol., 171, 342-348 (1989)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

従って本発明は、不純物であるピルビン酸等の生産性が低下したD-乳酸発酵液を製造できる微生物を構築することによって、精製負荷の少ない高品質のD-乳酸溶液を得る新規なD-乳酸の製造方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、上記の点に鑑み鋭意検討を行った結果、微生物培養液中に存在するピルビン酸の一部が、実際にdldによってD-乳酸から生成されていることを見出し、さらにdld遺伝子が実質的に不活化された微生物を育種し培養することによって、当該微生物の増殖が宿主と比較して抑制されないこと、および培地中のピルビン酸含有濃度が低下した高品質のD-乳酸を含む培養液が得られることを見出した。さらに、ピルベートホルメートリアーゼをコードするpflB遺伝子の欠失、且つ/またはldhの菌体内活性を増強し、且つdld遺伝子が実質的に不活化された微生物を育種し培養することによって、培地中のピルビン酸、ギ酸、酢酸含有濃度が低下した高品質のD-乳酸が得られることを見出し本発明を完成した。

【0011】

すなわち、本発明は以下のとおりである。

[1]該微生物が本来有しているFAD依存性D-乳酸デヒドロゲナーゼ(dld)が不活化あるいは低減されている微生物であって、ピルベートホルメートリアーゼ(pflB)が不活化あるいは低減されている、且つ/またはNADH依存性D-乳酸デヒドロゲナーゼ(ldh)の細胞内活性が増強されていることを特徴とする微生物。

[2]微生物が細菌である[1]に記載の微生物。

[3]細菌がエシェリヒア コリである[2]に記載の細菌。

[4][1]~[3]の何れか一項に記載の微生物を液体培地で培養し、培養液中にD-乳酸を生成蓄積せしめ、培養液からD-乳酸を分離することを特徴とするD-乳酸の生産方法。

[5]FAD依存性D-乳酸デヒドロゲナーゼが不活化あるいは低減されている微生物を液体培地で培養し、培養液中にD-乳酸を生成蓄積せしめ、培養液からD-乳酸を分離することを特徴とするD-乳酸の生産方法。

[6]微生物が細菌である[5]に記載の方法。

[7]細菌がエシェリヒア コリである請求項[6]に記載の方法。

[8]通気条件下で培養することを特徴とする[5]~[7]の何れか一項に記載の方法。

【発明の効果】

【0012】

本発明により作製された菌体を使用しD-乳酸を生産することにより、既存の方法に比較して不純物であるピルビン酸含量の低下した、精製負荷の少ない高品質のD-乳酸発酵液を製造できるようになる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

本発明におけるFAD依存性D-乳酸デヒドロゲナーゼ(dld)とは、補酵素FADの存在下において、ピルビン酸からD-乳酸、又はD-乳酸からピルビン酸に至る代謝経路を触媒する酵素を指す。

本発明におけるピルベートホルメートリアーゼ(pflB)とは、ピルビン酸からギ酸、又はギ酸からピルビン酸に至る代謝経路を触媒する酵素を指す。

【0014】

本発明におけるdldやpflBの酵素機能の不活化とは、その酵素活性が完全に消失することを意味する。本発明におけるdldやpflBの酵素機能の低減とは、その酵素活性の一部が消失することを意味する。酵素機能を不活化、あるいは低減するには、そのタンパク質をコードする遺伝子に変異を導入するか、欠失させる、あるいはそのタンパク質を特異的に不活化する薬剤を添加する、紫外線を照射する、などの方法がある。実施例には、そのタンパク質をコードする遺伝子を欠失させる方法を示した。

【0015】

本発明におけるNADH依存性D-乳酸デヒドロゲナーゼ(ldh)とは、補酵素NADH存在下において、ピルビン酸からD-乳酸、又はD-乳酸からピルビン酸に至る代謝経路を触媒する酵素を指す。またNADH依存性D-乳酸デヒドロゲナーゼの細胞内活性が増強されるとは、該微生物の遺伝子に変異を導入したり、ある種の遺伝子を発現型プラスミドに組み込みそれを該微生物内に導入すること等により、該微生物内のNADH依存性D-乳酸デヒドロゲナーゼの活性が向上することを意味する。

【0016】

本発明における微生物とは、本来D-乳酸生産能を有する微生物であるか、又はD-乳酸生産能を有さない微生物に関わらず、何らかの改変を加えることによってD-乳酸生産能を有するようになった微生物を指す。

【0017】

本発明における微生物は分類学上細菌等の原核微生物に属するものが考えられるが、細菌の中ではヘテロ乳酸発酵細菌、特に大腸菌が例示される。

【0018】

本発明における培地とは、微生物が生育する上で必要な成分を含む生育環境を意味する。即ち、該微生物がD-乳酸を生産するために必要な炭素源、窒素源、無機イオンを含み、さらに菌体が要求する有機微量元素、アミノ酸、核酸等が含まれた生育環境であれば、特に制限はない。培地は通常、液体培地である。

【0019】

本発明における培養条件は作成された菌体、培養装置により変動するが、実施例に用いたMG1655においては、中性もしくは中性よりややアルカリ性側のpHで最大の生産性を得られ、培養pHは6.9から7.4、より好ましくは7.1から7.3である。培養温度は33℃から42℃で培養することで最大の生産性を得ることができる。

【0020】

培養に際して、通常は温度、pH、通気条件、攪拌速度を制御し得る培養槽を用いるのが一般的であるが、本発明の培養に際しては培養槽を使用することに限定されない。培養槽を用いて培養する場合には、必要により、予め前培養として種培養を行いこれを必要量予め調製しておいた培養槽内の培地に接種してもよい。

【0021】

本発明の培養時の通気条件は、通気を全く行わなくとも乳酸を生産することは可能であるが、より好ましい結果を得るために通気を行ったほうがよい。ここで言う通気条件下とは必ずしも培養液中を空気が通過する必要はなく、培養槽の形状によっては適度に培養液を攪拌しながら培養液上の空気層が換気されるような上面通気も含み、培養槽の内部に酸素を含む気体を流入させることを意味する。液中に通気する場合は内圧、攪拌羽根位置、攪拌羽根形状、攪拌速度の組み合わせにより溶存酸素濃度が変化するために乳酸の生産性および次のような指標により最適条件を求めることができる。例えば上記大腸菌をABLE社製培養装置BMJ-01等の比較的小型の培養槽で培養する場合は、500gの培養液を使用した際、空気を常圧で0.01vvm~1vvm、攪拌速度50rpm~500rpm、より好ましくは、常圧で0.1vvm~0.5vvm、攪拌速度100rpm~400rpmで達成し得る通気条件で好ましい結果を得ることができる。この条件は通気攪拌条件が温度30℃の水を対象とした場合常圧で酸素移動速度係数 $k_L a$ が 1 h^{-1} 以上 400 h^{-1} 以下、より好ましくは 1 h^{-1} 以上 200 h^{-1} 以下となる条件で達成し得る酸素供給を可能とする条件である。

【0022】

上述した通気条件は培養初期から終了まで一貫して行う必要はなく、培養工程の一部で行うことでも好ましい結果を得ることができる。

【0023】

本発明にいうD-乳酸を生成蓄積することとは、培地中のD-乳酸濃度が有意に増加することを意味する。

【0024】

本発明にいうD-乳酸を回収することとは、培地中から主としてD-乳酸を精製分離することを意味する。具体的には、炭酸カルシウムを添加してD-乳酸と反応させ、乳酸カルシウムとして晶析し、溶解性不純物を分離した後、硫酸と反応させて乳酸に転換し、カルシウム分を硫酸カルシウム結晶として分離する方法を例示することができるが、主としてD-乳酸を回収し得る方法であれば、特に限定はない。

【0025】

以下、当該微生物の入手法を例示するが本発明はこれらの例に限定されるものではない。

(1) エシェリヒア コリMG1655株dld遺伝子欠失株の作成
微生物としてエシェリヒア コリを用いる。該エシェリヒア コリMG1655株のゲノムDNAの全塩基配列は公知であり (GenBank accession number U00096)、エシェリヒア コリのFAD依存性D-乳酸デヒドロゲナーゼ (dld) 遺伝子の塩基配列も報告されている (GenBank accession number X01067)。dld遺伝子はGenBank accession number U00096の塩基配列情報において、2219962-2222302に記されており、dld遺伝子の5'側近傍領域及び3'側近傍領域は、PCR法を用いて増幅取得することができる。PCRの鋳型DNAとしてはエシェリヒア属細菌、例えばエシェリヒア コリMG1655株、W3110株、ATCC11303株等の染色体DNAを例示できる。尚、MG1655株、W3110株、ATCC11303株はアメリカンタイプカルチャーコレクションより入手することができる。

【0026】

次に、PCRによって得られた5'側近傍領域をコードするDNA断片の3'側と、3'側近傍領域をコードするDNA断片の5'側をT4 DNA ligaseなどにより連結する。このとき、5'側近傍領域をコードするDNA断片と、3'側近傍領域をコードするDNA断片の間に新しく導入したいDNA配列を挿入して連結しても良い。連結して得たDNA断片を更に、温度感受性クローニングベクターpTH18cs1 (GenBank accession number AB019610)、pTH18ks1 (GenBank accession number AB019604) などから得る

ことができる温度感受性複製起点とアンピシリン、クロラムフェニコール耐性遺伝子などの薬剤耐性マーカーと連結して組換えプラスミドを作製する。

【0027】

上記のようにして得たプラスミドでエシェリヒア コリを形質転換し、続いてプラスミドが有する薬剤耐性マーカーに対応する薬剤を含む液体培地で、温度感受性複製起点が機能する温度で培養することにより、組換えプラスミド上の d l d 遺伝子近傍領域とゲノム DNA 上の d l d 遺伝子近傍領域とで相同組換えが起き、プラスミド全長がゲノム DNA に組み込まれた形質転換体を得る。これを薬剤耐性マーカーに対応する薬剤を含む固形培地で、温度感受性複製起点が機能しない温度で培養することにより、プラスミドを保持しない形質転換体を得る。さらに薬剤を含まない液体培地で、温度感受性複製起点が機能する温度で培養することにより、ゲノム DNA に組み込まれたプラスミド由来の d l d 遺伝子近傍領域と本来のゲノム DNA 上の d l d 遺伝子近傍領域とで相同組換えが起き、組み込まれたプラスミドまたはゲノム DNA 上の d l d 遺伝子領域がプラスミドとして排出された形質転換体を得る。これを薬剤を含まない固形培地で、温度感受性複製起点が機能しない温度で培養することにより、ゲノム DNA 上の d l d 遺伝子領域がプラスミドとして排出された形質転換体を得る。さらに得られたコロニーを薬剤耐性マーカーに対応する薬剤を含む固形培地と薬剤を含まない固形培地で、温度感受性複製起点が機能しない温度で培養し、薬剤を含まない固形培地でのみ生育するコロニーを選抜し、目的とする細胞を得る。このようにして得られた形質転換体の染色体上には、F A D 依存性 D-乳酸デヒドロゲナーゼ (d l d) 遺伝子の 5' 側近傍領域、及び 3' 側近傍領域のそれぞれと相同な領域が存在する。

【0028】

(2) エシェリヒア コリ MG1655 株 p f l B 遺伝子欠失株の作成

上記 (1) と同様に、エシェリヒア コリ MG1655 株のゲノム DNA の全塩基配列は公知であり (GenBank accession number U00096)、エシェリヒア コリのピルベートホルメトリアーゼ (p f l B) 遺伝子の塩基配列も報告されている (GenBank accession number X08035)。p f l B 遺伝子は GenBank accession number U00096 の塩基配列情報において、949266-952858 (Revers) に記されており、p f l B 遺伝子の 5' 側近傍領域及び 3' 側近傍領域は、PCR 法を用いて増幅取得することができる。PCR の鋳型 DNA としてはエシェリヒア属細菌、例えばエシェリヒア コリ MG1655 株、W3110 株、ATCC11303 株等の染色体 DNA を例示できる。尚、MG1655 株、W3110 株、ATCC11303 株はアメリカンタイプカルチャーコレクションより入手することができる。

【0029】

次に、PCR によって得られた 5' 側近傍領域をコードする DNA 断片の 3' 側と、3' 側近傍領域をコードする DNA 断片の 5' 側を T4 DNA ligase などにより連結する。このとき、5' 側近傍領域をコードする DNA 断片と、3' 側近傍領域をコードする DNA 断片の間に新しく導入したい DNA 配列を挿入して連結しても良い。連結して得た DNA 断片を更に、温度感受性クローニングベクター pTH18csl (GenBank accession number AB019610)、pTH18ksl (GenBank accession number AB019604) などから得ることができる温度感受性複製起点とアンピシリン、クロラムフェニコール耐性遺伝子などの薬剤耐性マーカーと連結して組換えプラスミドを作製する。

【0030】

上記のようにして得たプラスミドでエシェリヒア コリを形質転換し、続いてプラスミドが有する薬剤耐性マーカーに対応する薬剤を含む液体培地で、温度感受性複製起点が機能する温度で培養することにより、組換えプラスミド上の p f l B 遺伝子近傍領域とゲノム DNA 上の p f l B 遺伝子近傍領域とで相同組換えが起き、プラスミド全長がゲノム DNA に組み込まれた形質転換体を得る。これを薬剤耐性マーカーに対応する薬剤を含む固

形培地で、温度感受性複製起点が機能しない温度で培養することにより、プラスミドを保持しない形質転換体を得る。さらに薬剤を含まない液体培地で、温度感受性複製起点が機能する温度で培養することにより、ゲノムDNAに組み込まれたプラスミド由来のpflB遺伝子近傍領域と本来のゲノムDNA上のpflB遺伝子近傍領域とで相同組換えが起き、組み込まれたプラスミドまたはゲノムDNA上のpflB遺伝子領域がプラスミドとして排出された形質転換体を得る。これを薬剤を含まない固形培地で、温度感受性複製起点が機能しない温度で培養することにより、ゲノムDNA上のpflB遺伝子領域がプラスミドとして排出された形質転換体を得る。さらに得られたコロニーを薬剤耐性マーカーに対応する薬剤を含む固形培地と薬剤を含まない固形培地で、温度感受性複製起点が機能しない温度で培養し、薬剤を含まない固形培地でのみ生育するコロニーを選抜し、目的とする細胞を得る。このようにして得られた形質転換体の染色体上には、ピルベートホルメートリアーゼ(pflB)遺伝子の5'側近傍領域、及び3'側近傍領域のそれぞれと相同な領域が存在する。

【0031】

(3) エシェリヒア コリMG1655株ldh遺伝子増強株の作成

上記(1)(2)と同様に、エシェリヒア コリMG1655株のゲノムDNAの全塩基配列は公知であり(GenBank accession number U00096)、エシェリヒア コリのNADH依存性D-乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子(ldh)の塩基配列も報告されている(GenBank accession number U36928)。ldh遺伝子はGenBank accession number U00096の塩基配列情報において、1438629-1442048(Reverse)に記載されており、遺伝子の5'側プライマーと3'側プライマーを用いてPCR法でldh遺伝子を増幅取得することができる。PCRの鋳型DNAとしてはエシェリヒア属細菌、例えばエシェリヒア・コリMG1655株、W3110株、ATCC11303株等の染色体DNAを例示できる。尚、MG1655株、W3110株、ATCC11303株はアメリカンタイプカルチャーコレクションより入手することができる。

【0032】

クローニングベクターの制限酵素サイトを確認し、予め5'側プライマーと、3'側プライマーに、アンピシリン、クロラムフェニコール耐性遺伝子などの薬剤耐性マーカーを組み込んだクローニングベクターと同じ制限酵素サイトを連結しておく。クローニングベクターにはpBR322(GenBank accession number X69022)などが例示できる。PCRにより増幅したldh遺伝子とクローニングベクターを制限酵素消化し、さらにT4DNA ligaseなどにより連結して組換えプラスミドを得る。上記のようにして得たプラスミドでエシェリヒア コリを形質転換し、アンピシリン、クロラムフェニコール等を含む培地で培養することにより、組換えプラスミド上にldh遺伝子を保持する形質転換体を得る。

以下に実施例により本発明の一例を示すが、これらは本発明をなんら制限するものではない。尚、特に記載しない限りは%は質量基準である。

【実施例1】

【0033】

エシェリヒア コリMG1655株dld遺伝子欠失株の作製

エシェリヒア コリのゲノムDNAの全塩基配列は公知であり(GenBank accession number U00096)、エシェリヒア コリのdld遺伝子の塩基配列も報告されている(GenBank accession number X01067)。アメリカンタイプカルチャーコレクションにより入手したエシェリヒア コリMG1655株の染色体DNAのdld遺伝子近傍領域の遺伝子情報に基づいて作製された、CAACACCAAGCTTTCGCG(配列番号1)とTTCCACTCCTTGTTGGTGGC(配列番号2)、AACTGCAGAAATTACGGATGGCAGAG(配列番号3)とTGTTCTAGAAAGTTCTTTGAC(配列番号4)を用いてPCRを行った。得られたフラグメントをそれぞれ、制限酵素HindIIIとPstI、

Pst IとXba Iで消化することにより、それぞれ約1140bpのフラグメントを得た。このフラグメントを温度感受性プラスミドpTH18cs1 (GenBank accession number AB019610) [Hashimoto-Gotoh, T., Gene, 241, 185-191 (2000)]をHind III、Xba Iで消化して得られるフラグメントと混合し、リガーゼを用いて結合した後、DH5 α 株に30℃で形質転換し、クロラムフェニコール10 μ g/mLを含むLB寒天プレートに生育する形質転換体を得た。得られたコロニーをクロラムフェニコール10 μ g/mLを含むLB液体培地で30℃で一晩培養し、得られた菌体からプラスミドを回収した。このプラスミドをMG1655株に30℃で形質転換し、クロラムフェニコール10 μ g/mLを含むLB寒天プレートに30℃で一晩培養し、形質転換体を得た。得られた形質転換体をクロラムフェニコール10 μ g/mLを含むLB液体培地に接種し、30℃で一晩培養した。次にこれらの培養菌体を得られるようにクロラムフェニコール10 μ g/mLを含むLB寒天プレートに塗布し、42℃で生育するコロニーを得た。得られたコロニーを薬剤を含まないLB液体培地で30℃で一晩培養し、さらに薬剤を含まないLB寒天プレートに塗布して42℃で生育するコロニーを得た。

【0034】

出現したコロニーの中から無作為に100コロニーをピックアップしてそれぞれを薬剤を含まないLB寒天プレートとクロラムフェニコール10 μ g/mLを含むLB寒天プレートに生育させ、薬剤を含まないLB寒天プレートにのみ生育するクロラムフェニコール感受性のクローンを選んだ。さらにこれらの目的クローンの染色体DNAからPCRによりd1d遺伝子を含む約2.0kb断片を増幅させ、d1d遺伝子領域が欠失している株を選抜し、以上を満足するクローンをd1d遺伝子欠失株とし、得られた株をMG1655 d1d遺伝子欠失株と命名した。

【実施例2】

【0035】

エシェリヒア コリMG1655株d1d遺伝子欠失株によるD-乳酸生産

前培養として三角フラスコにいったLB Broth, Miller培養液(Difco 0244620)25mLにMG1655株、またはMG1655 d1d遺伝子欠失株を植菌し、一晩、120rpmで攪拌培養を行った。各々の前培養液全量を、(表1)に示す組成の培地475gの入ったABLE社製培養装置BMJ-01の培養槽に移し、培養を行った。培養は大気圧下、通気量0.5vvm、攪拌速度200rpm、培養温度31℃、pH6.7(NaOHで調整)で96時間行った。48時間後、および培養終了後、乳酸、ピルビン酸、ギ酸および酢酸の培養液中濃度を測定した。これらの有機酸の定量には高速液体クロマトグラフィーを用い、以下の条件で分離を行った。

【0036】

分析カラム: ULTRON PS80-H (300 \times 8.0mm I. D.) 信和化工

カラム温度: 60℃

移動相: 過塩素酸水溶液 pH2.0

流速: 1.0mL/min

【0037】

MG1655株、MG1655 d1d遺伝子欠失株それぞれをWild、d1d-と表記して48時間後の結果を(表2)に、培養終了時の結果を(表3)に示す。

【0038】

【表1】

培地組成

Glucose	100 g/L
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	6.0 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	6.0 g/L
KH ₂ PO ₄	3.0 g/L
NaCl	3.0 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1 g/L
酵母エキス	0.5 g/L
カザミノ酸	5.0 g/L

【0039】

【表2】

48時間の結果

	Wild	did-
D-乳酸蓄積量	26 g/L	22 g/L
ピルビン酸蓄積量	4.5 g/L	1.1 g/L
ギ酸蓄積量	5.0 g/L	1.55 g/L
酢酸蓄積量	14 g/L	9.5 g/L

【0040】

【表3】

96時間の結果

	Wild	did-
D-乳酸蓄積量	36 g/L	41 g/L
ビルビン酸蓄積量	5.84 g/L	1.26 g/L
ギ酸蓄積量	3.4 g/L	0 g/L
酢酸蓄積量	12 g/L	11 g/L

【実施例3】

【0041】

エシェリヒア コリMG1655株 p f l B 遺伝子欠失株及びMG1655 d l d、p f l B 遺伝子欠失株作製

エシェリヒア コリの p f l B 遺伝子の塩基配列は既に報告されている (GenBank accession number X08035)。MG1655株の染色体DNAの p f l B 遺伝子近傍領域の遺伝子情報に基づいて作製された、GCACGAAAGCTT TGATTACG (配列番号5) と TTATTGCATGCTTAGATTTGACTG AAATCG (配列番号6)、TTATTGCATGCTTATTTACTGCGTAC TTCG (配列番号7) と AAGGCCTACGAAAAGCTGCAG (配列番号8) を用いてPCRを行った。得られたフラグメントをそれぞれ、制限酵素HindIIIとSphI、SphIとPstIで消化することにより、それぞれ約1770bp、約1340bpのフラグメントを得た。このフラグメントを温度感受性プラスミドpTH18c s1をHindIII、PstIで消化して得られるフラグメントと混合し、リガーゼを用いて結合した後、DH5 α 株に30℃で形質転換し、クロラムフェニコール10 μ g/mLを含むLB寒天プレートに生育する形質転換体を得た。得られたコロニーをクロラムフェニコール10 μ g/mLを含むLB液体培地で30℃で一晩培養し、得られた菌体からプラスミドを回収した。このプラスミドをMG1655株、およびMG1655 d l d 遺伝子欠失株に形質転換し、クロラムフェニコール10 μ g/mLを含むLB寒天プレートに生育する形質転換体を得た。得られた形質転換体をクロラムフェニコール10 μ g/mLを含むLB液体培地に接種し、30℃で一晩培養した。次にこれらの培養菌体を得られるようにクロラムフェニコール10 μ g/mLを含むLB寒天プレートに塗布し、42℃で生育するコロニーを得た。得られたコロニーを薬剤を含まないLB液体培地で30℃で一晩培養し、さらに薬剤を含まないLB寒天プレートに塗布して42℃で生育するコロニーを得た。

【0042】

出現したコロニーの中から無作為に100コロニーをピックアップしてそれぞれを薬剤を含まないLB寒天プレートとクロラムフェニコール10 μ g/mLを含むLB寒天プレートに生育させ、薬剤を含まないLB寒天プレートにのみ生育するクロラムフェニコール感受性のクローンを選んだ。さらにこれらの目的クローンの染色体DNAからPCRにより p f l B 遺伝子を含む約2.0kb断片を増幅させ、p f l B 遺伝子領域が欠失している株を選抜し、以上を満足するクローンを p f l B 遺伝子欠失株とし、得られた株をMG1655 p f l B 遺伝子欠失株及びMG1655 d l d、p f l B 遺伝子欠失株と命名した。

【実施例4】

【0043】

ldh発現ベクターおよびldh発現ベクター形質転換体の構築
エシェリヒア コリのldh遺伝子の塩基配列は既に報告されている (GenBank accession number U36928)。serine hydroxymethyltransferase (glyA) プロモーターを取得するため大腸菌ゲノムDNAをテンプレートに用いてGGAATTCTGTCGACCGGCTCCAGTTCGAAGCTGGT (配列番号9)、及びGGAATTCTGACTCAGCTAACAATAAAATTTTT (配列番号10) によりPCR法で増幅し、得られたフラグメントを制限酵素EcoRIで消化することで約850bpのglyAプロモーターをコードするフラグメントを得た。さらにD-乳酸デヒドロゲナーゼ構造遺伝子 (ldh) を取得するために大腸菌ゲノムDNAをテンプレートに用いてGGAATTCGGAGAAAGTCTTATGAAACT (配列番号11)、及びCCCAAGCTTTTAAACCA GTTCGTTCGGGC (配列番号12) によりPCR法で増幅し、得られたフラグメントを制限酵素EcoRI及びHindIIIで消化することで約1.0kbpのD-乳酸デヒドロゲナーゼ構造遺伝子 (ldh) フラグメントを得た。上記の2つのフラグメントとプラスミドpUC18を制限酵素EcoRI及びHindIIIで消化することで得られるフラグメントを混合し、リガーゼを用いて結合した後、DH5 α 株に37℃で形質転換し、アンピシリン1 μ g/mLを含むLB寒天プレートに生育する形質転換体を得た。得られたコロニーをアンピシリン1 μ g/mLを含むLB液体培地で30℃で一晩培養し、得られた菌体からプラスミドpGlyldhを回収した。このプラスミドpGlyldhをMG1655 dld遺伝子欠失株、MG1655 dld & pflB遺伝子欠失株に形質転換し、アンピシリン1 μ g/mLを含むLB寒天プレートで37℃で一晩培養することによりMG1655 dld遺伝子欠失/pGlyldh株、MG1655 dld & pflB遺伝子欠失/pGlyldh株を得た。

【実施例5】

【0044】

MG1655株、MG1655 dld遺伝子欠失株、MG1655 pflB遺伝子欠失株、MG1655 dld & pflB遺伝子欠失株、MG1655 dld遺伝子欠失/pGlyldh株、MG1655 dld & pflB遺伝子欠失/pGlyldh株によるD-乳酸生産

前培養として三角フラスコにいったLB Broth, Miller培養液25mLにMG1655株、MG1655 dld遺伝子欠失株、MG1655 pflB遺伝子欠失株、MG1655 dld & pflB遺伝子欠失株、MG1655 dld遺伝子欠失/pGlyldh株、MG1655 dld & pflB遺伝子欠失/pGlyldh株を植菌し、一晩、120rpmで攪拌培養を行った。各々の前培養液全量を、(表1)に示す組成の培地475gの入ったABLE社製培養装置BMJ-01の培養槽に移し、培養を行った。培養は大気圧下、通気量0.5vvm、攪拌速度200rpm、培養温度31℃、pH6.7 (NaOHで調整) で96時間行った。培養終了後、乳酸、ピルビン酸、ギ酸および酢酸の培養液中濃度を測定した。これらの有機酸の定量条件は実施例2に示した。

【0045】

96時間後の結果を(表4)に示す。なお、AはMG1655株、BはMG1655 dld遺伝子欠失株 (実施例1)、CはMG1655 pflB遺伝子欠失株 (実施例3)、DはMG1655 dld & pflB遺伝子欠失株 (実施例3)、EはMG1655 dld遺伝子欠失/pGlyldh株 (実施例4)、FはMG1655 dld & pflB遺伝子欠失/pGlyldh株 (実施例4) による結果を示す。

【0046】

【表 4】

	A	B	C	D	E	F
D-乳酸蓄積量	4.0	41.5	6.0	6.1	4.3	6.5
ピルビン酸蓄積量	2.7	1.0	2.3	1.1	0.9	0.7
ギ酸蓄積量	4.0	3.5	ND	ND	3.5	ND
酢酸蓄積量	1.1	7.3	4.4	4.3	7.0	4.2

表中の数値の単位は全て g/L

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Mitsui Chemicals, Inc.

<120> A Method for production of D-lactic acid in which the productivity of pyruvic acid is reduced

<130> P0002592

<160> 12

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for PCR

<400> 1

caacaccaag ctttcgcg 18

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>Primer for PCR

<400> 2

ttccactcct tgttgtggc 19

<210>3

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for PCR

<400> 3

aactgcagaa attacggatg gcagag 26

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>Primer for PCR

<400> 4

tgttctagaa agttctttga c 21

<210>5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>Primer for PCR

<400> 5
gcacgaaagc ttgattacg 20

<210> 6
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<223> Primer for PCR
<400> 6
ttattgcatg cttagatttg actgaaatc g 31

<210> 7
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer for PCR
<400> 7
ttattgcatg cttatttact gcgtacttcg 30

<210>8
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer for PCR
<400> 8
aaggcctacg aaaagctgca g 21

<210> 9
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223>Primer for PCR
<400> 9
ggaattcgtc gaccggctcc agttcgaagc tggt 34

<210> 10
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>32
<223> Primer for PCR
<400> 10
ggaattctga ctcagctaac aataaaattt tt 32

<210> 11
<211> 28
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 11

ggaattccgg agaaagtcctt atgaaact 28

<210> 12

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for PCR

<400> 12

cccaagcttt taaaccagtt cgttcgggc 29

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 不純物であるピルビン酸等の生産量を低減するD-乳酸発酵液を製造できる微生物を構築することによって、精製負荷の少ない高品質のD-乳酸溶液を得る新規なD-乳酸の製造方法を提供する。

【解決手段】 FAD依存性D-乳酸デヒドロゲナーゼが実質的に不活化あるいは低減された微生物を育種し培養することにより、培地中のピルビン酸が低下した高品質のD-乳酸が得られることを見出した。さらにFAD依存性D-乳酸デヒドロゲナーゼが実質的に不活化あるいは低減され、且つピルベートホルメートリアーゼが不活化あるいは低減され、且つ/またはNADH依存性D-乳酸デヒドロゲナーゼの細胞内活性が増強された微生物を育種し、当該微生物を液体培地で培養することによって液体培地中のピルビン酸、ギ酸、酢酸含有濃度が低下した高品質のD-乳酸が得られる。

【選択図】 なし

特願 2003-340062

出願人履歴情報

識別番号

[000005887]

1. 変更年月日 1997年10月 1日
[変更理由] 名称変更
住所 東京都千代田区霞が関三丁目2番5号
氏名 三井化学株式会社
2. 変更年月日 2003年11月 4日
[変更理由] 住所変更
住所 東京都港区東新橋一丁目5番2号
氏名 三井化学株式会社